Aus der Universitätsfrauenklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. R. Buchholz

CHARAKTERISIERUNG UND BESTIMMUNG DER SULFOKINASEAKTIVITÄT IN FOLLIKEL- UND CORPORA-LUTEA-GEWEBE AUS RINDEROVARIEN

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Medizin des Fachbereiches Humanmedizin der
PHILIPPS-UNIVERSITÄT MARBURG / LAHN

vorgelegt von

ELISABETH HANNAPPEL
aus Hadamar

Marburg 1978

1979

Aus der Universitätsfrauenklinik in Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. R. Buchholz

CHARAKTERISIERUNG UND BESTIMMUNG DER SULFOKINASEAKTIVITÄT IN FOLLIKEL– UND CORPORA–LUTEA–GEWEBE AUS RINDEROVARIEN

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten
Medizin des Fachbereiches Humanmedizin der
PHILIPPS–UNIVERSITÄT MARBURG / LAHN

vorgelegt von

ELISABETH HANNAPPEL
aus Hadamar

Marburg 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 2.3.1979

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof.Dr.med. Neurath
Referent: Prof.Dr.rer.nat. Sturm
Correferent: Prof. Dr.med. Daume

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung

2. Materialien
2.1. Abkürzungen und Trivialnamen
2.2. Reagenzien und Lösungen
2.3. Geräte und andere Hilfsmittel
2.4. Biologische Materialien

3. Methodik
3.1. Gewinnung des Mikrosomenüberstandes
3.2. Enzymtest
3.3. Isolierung der Steroide und ihrer Sulfate
3.4. Messung der Radioaktivität
3.5. Berechnung der Sulfatierungsraten
3.6. Proteinbestimmung

4. Ergebnisse
4.1. Vorversuche
4.1.1. Konzentration der Cofaktoren
4.1.2. Enzymkonzentration
4.1.3. Zeitabhängigkeit
4.2. Charakterisierung der 3-Hydroxyaryl- und 17ß-ol-Sulfokinasen
4.2.1. pH-Optima
4.2.2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration
4.2.3. Bestimmung der K_M-Werte
4.3. Untersuchung der Sulfokinaseaktivität in verschiedenen Strukturen des Rinderovars
4.3.1. Messung der Steroidsulfatierung im Mischovar
4.3.2. Messung der Steroidsulfatierung in gepoolten Follikel- und Corpora-lutea-Präparationen
4.3.3. Messung der Steroidsulfatierung in Follikeln bzw. Corpora lutea aus einzelnen Ovarien

5. Diskussion

6. Zusammenfassung

7. Literaturverzeichnis

1. EINLEITUNG

Seit langem ist bekannt, daß Hormone als wasserlösliche Konjugate mit dem Urin ausgeschieden werden. So wiesen SCHACHTER und MARRIAN (39,40) vor mehr als 30 Jahren Östronsulfat und Östronglucuronid im Urin trächtiger Stuten nach. 1942 isolierten und identifizierten VENNIG et al. (52) Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-Sulfat) aus dem Urin eines Mannes mit Hodentumor. Im gleichen Jahr gelang MUNSON et al. (25,26) der Nachweis von DHEA-Sulfat aus dem Urin gesunder Männer.

Zunächst hielt man die Konjugatbildung nur für eine Möglichkeit des Organismus, die Ausscheidung der Hormone durch Erhöhung ihrer Wasserlöslichkeit zu verbessern. Als alleiniger Bildungsort dieser Konjugate wurde die Leber angesehen, und in Gewebspräparationen dieses Organs konnten auch die entsprechenden Enzymsysteme nachgewiesen werden (34,36,54).

1962/63 fand man aber, daß in vivo auch im menschlichen Nebennierengewebe DHEA-Sulfat synthetisiert werden kann (11,51). Zum gleichen Zeitpunkt wurde von BAULIEU (9) im venösen Blut der Nebenniere eine höhere Konzentration an DHEA-Sulfat als im peripheren gemessen, und er vermutete, daß auch andere endokrine Organe Steroidsulfate synthetisieren können. Bis jetzt gelangen beim Menschen die Isolierung von Steroidsulfaten in Blut, Urin, Galle und Faeces und der Nachweis ihrer Bildung in Leber, Niere, Nebenniere, Gehirn, Placenta, Ovar, Testis, Prostata und Tumoren der Mamma und der Nebennieren (9,10,11,12,13, 24,51,52,63,55).

1965 zeigten PAYNE und MASON (33), daß mikrosomenfreie Extrakte (32) aus Rindergewebe 4-^{14}C-Östradiol zum Östradiol-3-sulfat umwandeln, wobei die Nebennierenrinde eine erheblich

höhere Sulfatierungsrate aufwies als Ovargewebe einer trächtigen Kuh. Im Gegensatz zum Rind wurden mit Rattenleberextrakten Östradiol-3- und -17-monosulfat sowie Östradiol-3,17-disulfat (32) gebildet, so daß auf Spezies- und Gewebsunterschiede der Sulfokinasen geschlossen werden konnte. Schon NOSE und LIPMAN (27) fanden 1958 zwei verschiedene Sulfokinasesysteme, eine Alkoholsulfokinase und eine Phenolsufokinase mit mehr oder weniger großer Substratspezifität und Aktivität in Ratten-, Kaninchen- und Lammleber. Ebenfalls 1965 untersuchten HOLCENBERG und ROSEN (18) die Sulfatierung von Steroiden im 100 000 x g Oberstand aus Rindergewebshomogenaten, indem sie radioaktiv markiertes Östron, DHEA, Testosteron und p-Nitrophenol anboten. Im Gegensatz zu den hohen Sulfatierungsraten in Placenta, Nebenniere und Leber konnte im Ovarialgewebe nur eine geringe Sulfatierung des Östron beobachtet werden, eine Sulfatierung von DHEA und Testosteron war im Ovarialgewebe nicht nachweisbar.
Eine meßbare Sekretion von Steroidsulfaten aus menschlichen Ovarien konnten KALLIALA et al. (19) 1970 in beiden Zyklusphasen nicht beobachten, was im Widerspruch zu WALLACE und SILBERMAN (54) sowie AAKVAAG und FYLLING (1) steht, welche in menschlichen Ovarhomogenaten bzw. in Ovarien unter langdauerndem FSH-Einfluß, bei Endometriose bzw. Stein-Leventhal-Syndrom (polycystische Ovarien) eine Steroidsulfatbildung fanden. Eine solche wird jedoch auch von MELVILLE und BRAUNSBERG (23) in 7 von 12 untersuchten menschlichen Ovarhomogenaten (12 000 x g Oberstand) nachgewiesen. Ebenso konnten LAATIKAINEN und

VIHKO (21) 1971 im peripheren Blut der Frau keine unterschiedlichen Konzentrationen der Mono- und Disulfate von Androstendiol und Pregnandiol in der Follikel- und Corpus-luteum-Phase messen, woraus auf eine höchstens unbedeutende Steroidsulfatierung im Ovar geschlossen wurde. Die Autoren berichten aber auch im gleichen Jahr zusammen mit LAITINEN (20), daß beim Mann eine HCG-Stimulation keinen Einfluß auf die im peripheren Blut meßbaren DHEA-, 5-Androsten-3ß,17ß-diol- und Pregnenolon-Sulfatkonzentrationen besitzt, während sie aber gleichzeitig in der Vena spermatica erhöhte Steroidsulfatspiegel messen. HAWKINS und OAKEY (17) beobachteten 1974 im Plasma der Frau zwar eine zyklische Veränderung des Östronsulfats, und NUNEZ et al. (29) bestätigten dies 1977 und fanden dies zusätzlich für Östradiolsulfat gültig. Sie alle vertreten jedoch die Ansicht, daß diese Sulfate peripher entstanden seien, wobei sie sich sowohl auf eigene Beobachtungen als auch auf die frühere Arbeit von RUDER et al. (37) beziehen, welche zeigte, daß das meiste, wenn nicht alles Östronsulfat aus einer peripheren Umwandlung stammt. Eine zyklusabhängige Steroidsulfatbildung im Ovar sollte dennoch - vergleicht man die Situation im Hoden (20) - nicht ausgeschlossen werden, zumal da das Ovar zur direkten Metabolisierung von Steroidsulfaten (DHEA-sulfat) befähigt ist, wie OERTEL et al. (30) schon 1967 gezeigt haben. Tatsächlich wurde 1973 von STURM et al. (42,43) nicht nur der Nachweis einer Testosteron-, Östron- und Östradiolsulfatbildung im in vitro perfundierten menschlichen Ovar geführt, sondern es wurde auch eine unter

HCG/HMG-Stimulation gesteigerte Östrogensulfatsekretion gefunden. Da durch fortlaufende Messungen des Sauerstoffs- und Glucoseverbrauchs sowie anderer Parameter des Energiestoffwechsels ein weitgehend physiologischer Zustand des Organs gesichert werden konnte, geben die in diesem Experiment gemachten Beobachtungen auch wichtige Hinweise auf eine mögliche physiologische in vivo Bedeutung der Sulfatierung.
Die enzymatische Sulfatierung selbst erfolgt in drei Schritten (27). Die beiden ersten dienen der Herstellung eines "aktiven Sulfats" (Phosphoadenylphosphosulfat = PAPS)

$$ATP + SO_4^{--} \rightleftharpoons APS + PP$$

$$APS + ATP \rightleftharpoons PAPS + ADP$$

Im dritten Schritt wird die Sulfatgruppe von PAPS auf eine phenolische Hydroxylgruppe durch eine Phenolsulfokinase (E.C.2.8.2.4.), als Beispiel Östron-Sulfokinase, oder auf eine alkoholische Hydroxylgruppe durch eine Alkoholsulfokinase (E.C.2.8.2.2.), als Beispiel 3ß-Hydroxysteroid-Sulfokinase, übertragen, wobei die Sulfokinasen in der cytoplasmatischen Fraktion (100 000 - 150 000 x g Überstand) lokalisiert sind (16).
Mittlerweile konnten verschiedene Sulfokinasen isoliert werden. Als ersten gelang NOSE und LIPMAN (27) 1958 in Kaninchenleber die unvollständige Trennung zweier Sulfokinasen, von denen eine Steroidalkohole, eine andere aber Östron und p-Nitrophenol sulfatiert. BANERJEE und ROY (7) trennten eine DHEA-Sulfokinase von einer Östron-Sulfokinase teilweise ab. Eingehend mit

der einzymatischen Sulfatierung von Steroiden in der Nebennierenrinde des Rindes und des Menschen befaßten sich die Arbeitsgruppe um ADAMS (2,3,4,5,6): ADAMS und POULOS (4) konnten so z.B. eine Östrogensulfokinase aus Rindernebennieren isolieren, die frei von anderen Sulfokinasen-Aktivitäten ist. BOSTRÖM und WENGLE (10) zeigten, daß die menschliche Leber eine Vielzahl von C_{17}-, C_{18}-, C_{19}- und C_{21}-Steroidsulfaten bilden kann, während GUGLER et al. (16) eine Steroidsulfokinase aus menschlichem Lebergewebe anreicherte, welche nur DHEA, Ätiocholanolon, Östron, Östradiol-18ß und Östriol, nicht aber zum Beispiel Testosteron sulfatierte.

Es wäre jedoch auch interessant, mehr über die Eigenschaften und das möglicherweise zyklusabhängige Verhalten der Sulfokinasen im tierischen und menschlichen Ovar zu erfahren, da die physiologische Bedeutung der Steroidsulfatierung im Ovar noch weitgehend ungeklärt ist. Dazu war es erforderlich, ein Testsystem für die Aktivität der Sulfokinasen aufzustellen, wobei zunächst Rinderovarien verwandt wurden, an denen auch die Aktivität der Enzymgruppe in Abhängigkeit vom zyklischen Funktionszustand gemessen werden sollte.

2. MATERIALIEN

2.1. Abkürzungen und Trivialnahmen

Folgende Abkürzungen finden Verwendung:

ADP/ATP	Adenosindiphosphat/-triphosphat
APS	Adenylphosphosulfat
DC	Dünnschichtchromatographie
Glycin-Puffer	Glycin/Natronlauge-Puffer
HCG	humanes Choriongonadotropin
HMG	humanes Menopausengonadotropin
PAPS	3'-Phosphoadenylphosphosulfat
Tris-Puffer	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan/Salzsäure-Puffer

Folgende Trivialnamen werden benutzt:

Androstendiol	Androst-5-en-3ß,18ßdiol
Ätiocholanolon	3α-Hydroxy-5ß-androstan-17on
Dehydroepi-androsteron	3ß-Hydroxy-androst-5-en-17on
Östron	3-Hydroxy-östra-1,3,5(10)trien-17on
Östadiol	Östra-1,3,5(10)trien-3,17ßdiol
Östriol	Östra-1,3,5(10)trien-3,16α, 17ßtriol
Pregnandiol	5ß-Pregnan-3a,20adiol
Pregnenolon	3ß-Hydroxy-pregn-5en-20on
Testosteron	17ß-Hydroxy-androst-4-en-3on

2.2 Reagenzien und Lösungen

Verwendet werden p.a. Lösungsmittel der Fa. Merck, Darmstadt, welche zum Teil vor Gebrauch redestilliert wurden. Äthanol Art. 972, Äthylacetat Art. 9623, Diäthyläther Art. 921, Essigsäure Art. 90063, konz. HCl Art. 317, konz. H_2SO_4 Art. 731, Methanol Art. 6009, 1n NaOH Art. 9137, Pyridin Art. 9728.

Die Chemikalien $CuSO_4$ Art. 2790, K_2SO_4 Art. 5153, $MgCl_2$ Art. 5833, Na_2CO_3 Art. 6392 und Folin-Reagenz Art. 9001 kamen ebenfalls von der Fa. Merck, Darmstadt.
APS wurde freundlicherweise von der Fa. Boehringer, Mannheim, zur Verfügung gestellt.
Die Steroide Testosteron, Östradiol und Östron wurden von der Fa. Merck, Darmstadt, und ihre Sulfate von Ikapharm, Ramat-Gan, Israel, gekauft.

Als Precursoren dienten 4-^{14}C-Testosteron (spez. Aktivität 57,5 µCi/µ Mol), 4-^{14}C-Östron (spez. Aktivität 56 µCi/ µMol) und 4-^{14}C-Östradiol (spez. Aktivität 58 µCi/ µMol) - Fa. Amersham-Buchler, Braunschweig -, die in einer Konzentration von 0.285, 0.28 bzw. 0.29 µCi/Testlösung eingesetzt wurden. Die Präparate wurden vor ihrer Verwendung dünnschichtchromatographisch auf ihre Reinheit und Einheitlichkeit geprüft.

Als Szintillationsflüssigkeit wurde Scintigel der Fa. Roth, Karlsruhe, benutzt.

2.3 Geräte und andere Hilfsmittel

Folgendes wurde für die Versuche benötigt:

Glas- Teflon- Homogenisator nach Potter-Elvehjem S 700 1030d (30ml),
Kühlzentrifuge (MSE L 4),
Ultrazentrifuge (Beckman L 50),
Flüssigkeitsszintillationszähler (Beckman LS 200),
Photometer (Beckman DB 2),
Kieselgelplatten 60 F, 254 (Fa. Merck, Darmstadt) Schichtdicke 250 µm, Größe 20x20 cm.

2.4. Biologische Materialien

Für die Messungen wurden Rinderovarien aus dem hiesigen Schlachthof verwandt, die unmittelbar nach der Schlachtung der Tiere in einem Eisbad bis zur Weiterverarbeitung im Labor aufbewahrt wurden. In den Tabellen I und II werden die Gewebe näher charakterisiert. Für die Präparationen F_1-F_7 bzw. C_1-C_6 wurden Follikel bzw. Corpora lutea aus dem umliegenden Ovargewebe herausgeschält. Dies war mit den Corpora lutea sehr leicht möglich, bei den Follikeln mußte jedoch besonders darauf geachtet werden, den nicht abtrennbaren Anteil perifollikulären Gewebes möglichst klein zu halten. Die Follikelflüssigkeit wurde abgesaugt.

Bezeichnung des"Cytosols"	Herkunft und Charakterisierung des"Cytosols"
M_1-M_8	Gewebe aus je fünf Ovarien mit Follikeln und Corpora lutea unterschiedlicher Größe
F_1	einzelne Follikel aus je fünf Ovarien mit einem Durchmesser von 0.2.-0.3cm
F_2	einzelne Follikel aus je fünf Ovarien mit einem Durchmesser von 0.4-0.6cm
F_3-F_7	einzelne Follikel aus je einem Ovar mit einem Durchmesser von 0.4-0.6cm
C_1	einzelne Corpora lutea aus je fünf Ovarien mit einem Durchmesser von 0.6-0.8cm
C_2-C_6	einzelne Corpora lutea aus je einem Ovar mit einem Durchmesser von 0.6-0.8cm

Tab. I Charakterisierung des "Cytosols"

Bezeichnung des "Cytosols"	Proteingehalt (mg/ml)	Proteingehalt (mg/ml Ansatz)
M_1	6.7	0.96
M_2	10.5	1.50
M_3	4.5	0.64
M_4	3.0	0.43
M_5	4.3	0.62
F_1	4.2	0.60
F_2	5.0	0.72
C_1	5.4	0.77

Tab. II Proteingehalt einzelner "Cytosole"

3. METHODIK

3.1. Gewinnung des Mikrosomenüberstandes (105 000 x g Oberstand, "Cytosol")

Das präparierte Ovargewebe wurde nach Abtupfen der anhaftenden Flüssigkeit zunächst mit einer Schere zerkleinert und ein gewogener Anteil des Gewebsbreies mit der vierfachen Menge gekühlter 0.25 m Rohrzuckerlösung/0.1 m Tris-Puffer pH 7.4 unter ständiger Kühlung homogenisiert. Von diesem Homogenat wurden durch zehnminütige Zentrifugation mit 3500 Upm (11 000 x g) die Zellmembranen, Kerne und Mitochondrien abgetrennt. Der Oberstand wurde dann nochmals eine Stunde lang bei 40 000 Upm (105 000 x g) zentrifugiert. Der so gewonnene Oberstand diente als "Cytosol" für die enzymatischen Bestimmungen und konnte in Portionen von 20 ml bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden. Abbildung I zeigt ein Schema des Vorganges.

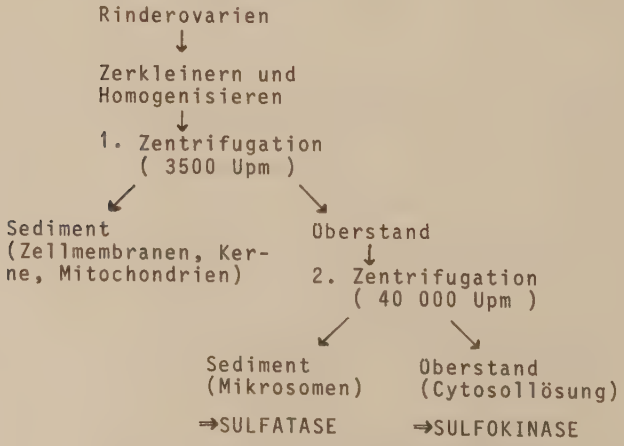

Abb.I Schema der Gewinnung des Mikrosomenüberstandes ("Cytosol")

3.2 Enzymtest

Die Sulfokinaseaktivität im Cytosol wurde im wesentlichen mit der Methode von DAO und LIBBY (12) gemessen, wobei jedoch nicht der ^{35}S-Einbau in die Steroidsulfate, sondern derjenige des ^{14}C-Anteiles bestimmt wurde. Unter Standardbedingungen wurden 16 nMol unmarkierte und 5 nMol ^{14}C-markierte Steroide in 25 µl Äthanol gelöst, im Schliffglas mit Tris-Puffer, der ATP, $MgCl_2$ und K_2SO_4 enthält, vermischt und auf 37°C vorgewärmt. Nach Zugabe von 0.2 ml Cytosol wurde die Testlösung 120 min. lang bei 37°C inkubiert.

21	nMol	^{14}C-Testosteron, ^{14}C-Östron bzw. ^{14}C-Östradiol (spez. Aktivität ca. 14 µCi/ µMol), gelöst in 25 µl Äthanol.
1.2	ml	0.1 m Tris-Puffer, pH 7.4, mit 1.4 µMol ATP, 2.8 µMol $MgCl_2$ und 7 µMol K_2SO_4
0.2	ml	Cytosollösung
1.4	ml	Totalvolumen

Da unter diesen Testbedingungen die Inkorporation von ^{14}C in Steroidsulfate sehr gering war und nach der dünnschichtchromatographischen Auftrennung in der Sulfatzone eine merkliche und zudem von DC-Platte zu DC-Platte unterschiedliche Absorption freier Steroide an das Kieselgel beobachtet wurde, erwies es sich als notwendig, für jeden Versuch jeweils sechs gleiche Proben anzusetzen: Drei wurden inkubiert (Hauptwert),

zwei als Blindwerte ohne Inkubation direkt mit Äther: Äthanol behandelt und aufgearbeitet, und ein Ansatz mit gekochtem Gewebe diente als Kontrollwert. In den späteren Untersuchungen wurde auf den letzteren verzichtet, da Blind- und Kontrollwert identische Ergebnisse brachten.

3.3 Isolierung der Steroide und ihrer Sulfate

Nach Beendigung der Reaktionszeit wurde die Testlösung mit festem Na_2SO_4 abgesättigt und die Steroide einschließlich der gebildeten Konjugate dreimal mit 2 ml wassergesättigtem Äther: Äthanol (3:1, v/v) extrahiert. Die wäßrige Phase wurde verworfen, die vereinigten Äther: Äthanol-Phasen eingedampft und der Rückstand in 1 ml Äthanol: Äther: H_2O (30:10:0.2, v/v) aufgenommen. Diese Lösung wurde auf etwa 100 µl eingedampft und in einer 4 cm langen Startlinie, die unmarkierte Steroidsulfate als Carrier enthielt, auf einer Kieselgelplatte aufgetragen. Zur Vermeidung von Verlusten wurde noch zweimal mit je 50 µl Äthanol: Äther: H_2O nachgespült und entsprechend aufgetragen.
Die dünnschichtchromatographische Auftrennung der Steroide und ihrer Sulfate erfolgte im Laufmittel Äthylacetat: Pyridin: Essigsäure: H_2O (62:21:6:11, v/v) über eine Strecke von 10 cm während zwei Stunden.
Die Lokalisierung der Steroide und ihrer Metabolite gelang mit Hilfe der jeweiligen Vergleichssubstanzen, die auf parallelen Bahnen mitgelaufen waren und durch Ansprühen mit konzentrierter H_2SO_4/Methanol (1:1, v/v) und anschließendem Erhitzen sichtbar gemacht wurden. So konnten eine ca. 2 cm

breite Zone, in der sich der größte Teil der freien Steroide befand, und eine ca. 1,5 cm breite Zone mit Steroidsulfaten markiert werden. Die freien Steroide laufen in diesem System an der Front, während die Steroidsulfate Rf-Werte von 0.35-0.45 haben. In der Abbildung II sind ein Dünnschichtchromatogramm und die Radioaktivitätsverteilung dargestellt.

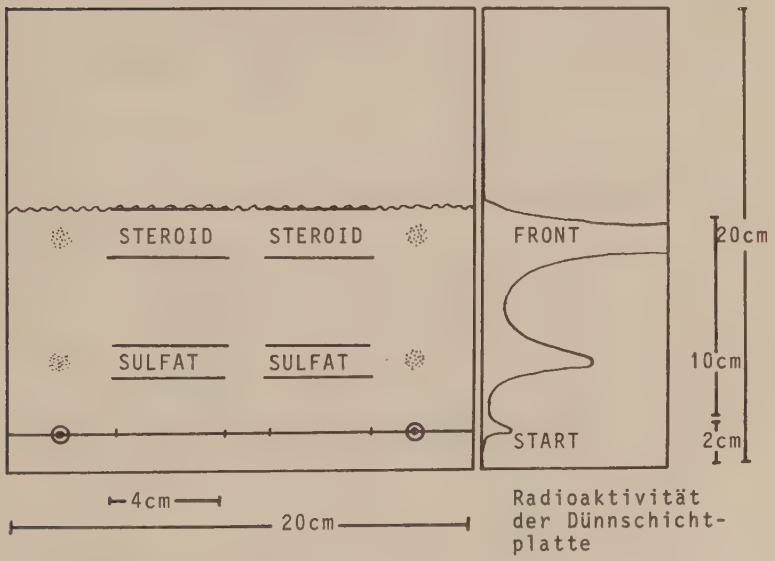

Abb. II Schema eines Dünnschichtchromatogramms und der Radioaktivitätsverteilung nach dem Modell einer Messung mit dem Dünnschicht-Scanner

3.4. Messung der Radioaktivität

Mit einem Skalpell wurde das Kieselgel der jeweiligen Zone abgekratzt, in ein Szintillatorgefäß überführt und in 15 ml Szintillationsflüssigkeit suspendiert. Eine der Zählung vorangehende Elution der Radioaktivität erwies sich als unnötig, da beide Verfahren zu den gleichen Ergebnissen führten.
Die Radioaktivität selbst wurde im Liquidszintillationszähler auf eine Genauigkeit von $\pm$ 1 % ausgezählt, die Zählausbeute für ^{14}C betrug bei diesem Gerät 90 %, eine Quenchkorrektur wurde gegebenenfalls durch externe Standardisierung vorgenommen.

3.5. Berechnung der Sulfatierungsraten

Die gemessene Radioaktivität der Zone der freien Steroide, die etwa 85-93% der ursprünglich eingesetzten Radioaktivität entsprach, und die der Steroidsulfatzone, wurden gleich 100 % gesetzt. Der prozentuale Anteil der gebildeten Steroidsulfate wurde dann nach Abzug des Blindwertes wie folgt berechnet:

$$\frac{\text{Radioaktivität der Steroidsulfate} \times 100\ \%}{\text{Gesamt-Radioaktivität der freien Steroide und Sulfate}} = \text{prozentualer Anteil der gebildeten Steroidsulfate}$$

Aus der bekannten Menge der Steroide im Testansatz konnte nun die gebildete Steroidsulfatmenge errechnet werden.

Meist werden die Steroidsulfate pro 1 ml Testansatz angegeben. Bei den Testlösungen M_1-M_5, F_1, F_2 und C_1, deren Proteingehalt bestimmt worden war, wurde die Umwandlungsrate auf 100 mg Protein bezogen.
Pro 1g eingesetztes Ovarialgewebe wurden die Ergebnisse wie folgt ermittelt:

Steroidsulfatmenge	=	Steroidsulfatmenge
1ml Inkubationslösung		0,029 g Ovarialgewebe

3.6 Proteinbestimmung

Der Eiweißgehalt einiger Cytosollösungen wurde nach der Methode von LOWRY bestimmt, dabei diente Rinderserumalbumin als Standardeiweiß.
Von der Stammlösung mit 2.5mg/ml Eiweiß und von den Cytosollösungen wurde jeweils eine Verdünnungsreihe aufgestellt (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64). Für die Messungen wurden die Lösungen A, B und C, die jedesmal wieder neu angesetzt werden mußte, und die Folin-Lösung verwandt.

Lösung A:	0.1n NaOH mit 2% Na_2CO_3
Lösung B:	Aqua dest. mit 1% Na-Tartrat und 0.5% $CuSO_4$ 5 H_2O
Lösung C:	50ml Lösung A und 1ml Lösung B
Folin-Lösung:	Folin-Reagenz und Aqua dest. (1:1, v/v)

Zu 0.2ml Cytosol- bzw. Standardlösung wurden 2ml Lösung C gegeben, nach 15 min

mit 0.2ml Folin-Lösung gut vermischt und nach 30 min. die Extinktion dieser Farblösung bei 650 nm gemessen. Anhand der Standardkurve aus der Rinderalbuminlösung wurde der Proteingehalt der Cytosollösungen bestimmt.

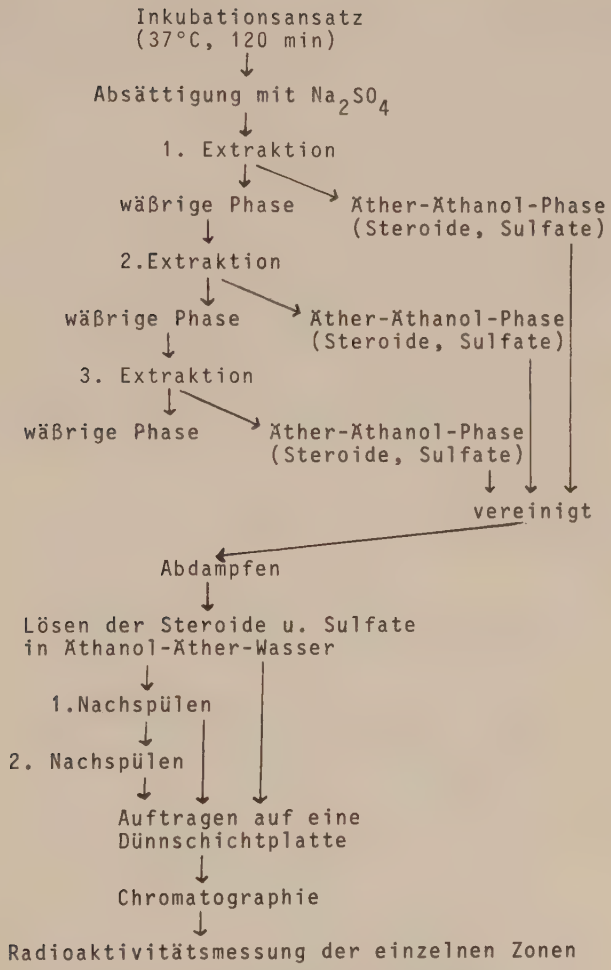

Abb. III Schema des Versuchsablaufes

4. ERGEBNISSE

4.1. Vorversuche

4.1.1. Konzentration der Cofaktoren

Zu Beginn der Untersuchungen mußten die Literaturangaben (12,23) überprüft und die günstigsten Bedingungen für die Messung der Sulfokinaseaktivität gefunden werden. Dazu wurden die Cytosollösungen M_1 und M_2 mit Testosteron als Substrat verwandt. Die ATP-, aber auch die ATP- und SO_4^{--}-Konzentrationen wurden variiert, während ansonsten wie unter den später gewählten Standardbedingungen gearbeitet wurde.
Im ersten Versuch wurden 10, 5, 1 und 0.1 µMol ATP pro 1ml Testansatz angeboten.

ATP (µMol/ml)	Mittelwert d. gebildeten Steroidsulfate (pMol/ml 2h)
10	24
5	45
1	102
0.1	16

Tab. III Testosteronsulfatierung in Abhängigkeit von dem ATP-Angebot unter Standardbedingungen, n=3

Weiterhin wurde geprüft, ob sich bei unterschiedlicher ATP- und K_2SO_4-Konzentration die Sulfatierungsrate ändert, da das für die Sulfatierung benötigte PAPS aus ATP und SO_4^{--} gebildet wird (34,35).

ATP (µMol/ml)	K_2SO_4 (µMol/ml)	gebildete Steroid-sulfate (pMol/ml 2h)
5	25	43
1	5	56
0.1	0.5	30

Tab. IV Testosteronsulfatierung in Abhängigkeit vom ATP- und SO_4^{--}-Angebot unter Standardbedingungen, n=3

Wie aus Tabelle III und IV ersichtlich wurden durch die Variation des ATP- und K_2SO_4-Angebotes keine wesentlichen Änderungen in der Sulfatierungsrate bewirkt; nur die Konzentration von 1µMol/ml ATP erwies sich günstiger als die in der Versuchsanordnung von DAO und LIBBY (12) angegebenen 5µMol/ml.

Es stellte sich aber die Frage, ob PAPS überhaupt ausreichend im Cytosol vorhanden ist bzw. gebildet werden kann. Da PAPS im Handel leider nicht erhältlich war, wurden 10µMol, 1µMol, 0.1µMol APS, eine Vorstufe von PAPS (34), pro 1ml Testansatz angeboten. Als Kontrollgruppe dienten Inkubationslösungen ohne APS, ansonsten wurde mit dem Cytosol M_3 und Testosteron als Substrat unter Standardbedingungen gearbeitet.

APS (µMol/ml)	gebildete Steroid-sulfate (pMol/ml 2h)
10	34
1	24
0.1	32
0.01	27
-	31

Tab. V Testosteronsulfatierung in Abhängigkeit vom APS-Angebot unter Standardbedingungen, n=3

Da bei zusätzlichem Angebot von APS Steroidsulfate nicht vermehrt gebildet werden, kann offensichtlich für die Enzymreaktion genügend APS von den im Cytosol vorhandenen Enzymen bereitgestellt werden (siehe Tabelle V).

4.1.2. Enzymkonzentration

Die Testosteronsulfatierung zeigte unter Standardbedingungen eine lineare Abhängigkeit von der Enzymkonzentration (Abbildung IV).

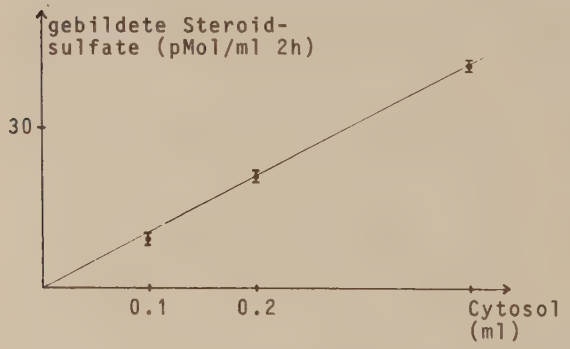

Abb. IV Testosteronsulfatierung in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration, Cytosollösung M_5, n=3

4.1.3. Zeitabhängigkeit

Die Steroidsulfatbildung aus Testosteron wurde nach einer 15, 30, 45, 60 und 120 minütiger Inkubation mit der Cytosollösung M_5 gemessen. Die Radioaktivität der Sulfatzone, die ohne vorhergehende Inkubation

gezählt wurde, entspricht dem Blindwert, der sonst bei Parallelversuchen gefunden wurde (Abbildung V).

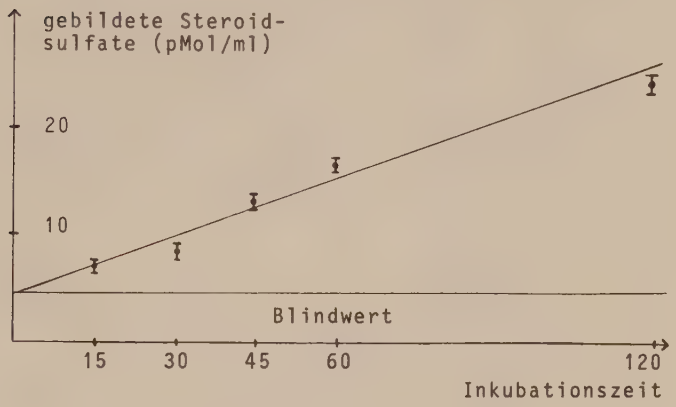

Abb. V Testosteronsulfatierung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit, n=3

4.2. Charakterisierung der 3-Hydroxyaryl- und 17β-ol-Sulfokinasen

4.2.1. pH-Optima

0.1m Tris-Puffer wurde auf pH 5.0, 6.0, 7.0, 7.2, 7.4, 8.0 und 9.0 eingestellt. Die Versuche wurden mit Testosteron und der Cytosollösung M_8 bzw. mit Östron bzw. Östradiol und der Cytosollösung M_6 unter Standardbedingungen durchgeführt (siehe Abbildung VI).

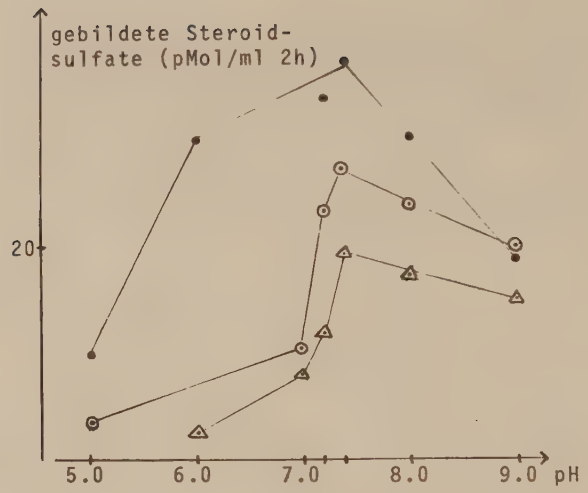

Abb.VI pH-Abhängigkeit der Testosteron, Östron- und Östradiol -17β-Sulfatierung unter Standardbedingungen, n=3

●—● Testosteronsulfatierung
△—△ Östronsulfatierung
⊙—⊙ Östradiol-17β-sulfatierung

Die Testosteronsulfatierung -17β-ol-Sulfokinase- zeigt ein ausgeprägtes pH-Optimum bei pH 7.4. Die Östrogene -3-Hydroxyaryl-sulfokinase- werden dagegen in einem breiten pH-Optimum von 7.4-9.0 sulfatiert.

4.2.2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration

Das Substratangebot von Testosteron, Östradiol bzw. Östron wurde unter ansonsten unveränderten Bedingungen der Standardinkubation variiert, als Cytosollösungen dienten hierbei M_2 und M_4 (Tabelle VI).

Precursor (nMol/ml)		gebildete Steroid-sulfate (pMol/ml 2h)
Testosteron:	405	68.4
	135	64.8
	45	50.3
	15	27.2
	5	14.2
Östradiol :	405	(53)
	135	39.3
	45	35.9
	15	31.0
	5	12.8
Östron :	405	-
	135	37.2
	45	34.5
	15	28.6
	5	18.4

Tab.VI Testosteron-, Östradiol-17β- und Östron-Sulfatierung in Abhängigkeit von der Substratkonzentration unter Standardbedingungen, n=5

Höhere Substratkonzentrationen als 405 nMol/ml wurden wegen der schlechten Wasserlöslichkeit der Steroide nicht angeboten. Zudem ergibt die dann ungünstige Relation zwischen markierten und unmarkierten Steroiden große Streuungen der Meßwerte. Aus diesen Gründen wurde bei den Versuchen nicht mit den hohen Substratkonzentrationen gearbeitet, obwohl üblicherweise Enzymmessungen ohne Substrathemmung im Bereich des 10-fachen K_M-Wertes vorgenommen werden.

4.2.3. Bestimmung der K_M-Werte

Die Michaelis-Menten-Konstante K_M wurde nach LINEWEAVER und BURK durch Auftragung der reziproken Substratkonzentrationen gegen die reziproken Sulfatierungsgeschwindigkeiten von Testosteron, Östradiol bzw. Östron graphisch ermittelt (Abbildung VII).
Hieraus ergaben sich die K_M-Werte 30, 10 bzw. 4 µMol/l für Testosteron, Östradiol bzw. Östron.

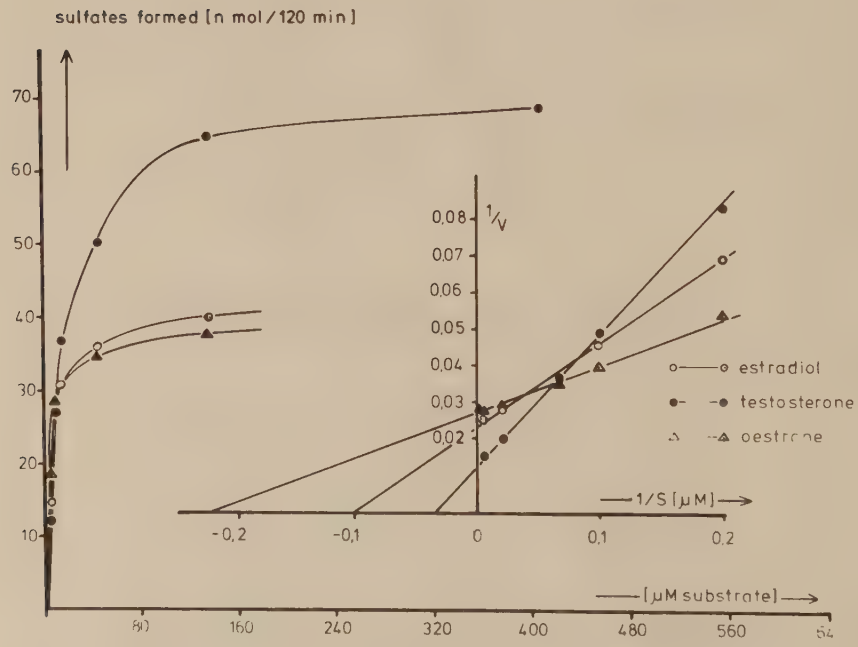

Abb. VII Sulfatierung von Testosteron (●—●), Östradiol (○—○) und Östron (△—△) in Relation zur Substratkonzentration;
Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante mit Hilfe der Transformation nach LINEWEAVER-BURK

4.3 Untersuchung der Sulfokinaseaktivität in verschiedenen Strukturen des Rinderovars

4.3.1. Messung der Steroidsulfatierung im Mischovar

Die Sulfatierung der Precursoren Testosteron, Östradiol und Östron wurde in Mischovarien - Cytosol M_3 und M_4 - unter Standardbedingungen vergleichend gemessen, um unterschiedliche Sulfatierungsraten, die wegen der zwei im Cytosol vorhandenen Sulfokinasen (E.C.2.8.2.2 und E.C.2.8.2.4) vermutet wurden, zu erfassen.

	gebildete Steroidsulfate (pMol/g Gewebe 2h) Mittelwert ± S.D. (n=3)	
Precursor	Cytosol-lösung M_4	Cytosol-lösung M_3
Testosteron	745 ± 40	1030 ± 200
Östron	470 ± 100	-
Östradiol	470 ± 30	-

Tab. VII Testosteron-, Östron- und Östradiol-17β-Sulfatierung in Mischovarien unter Standardbedingungen

Die Tabelle VII zeigt, daß bei gleich großem Substratangebot Testosteron etwas stärker sulfatiert wird als die beiden Östrogene.

4.3.2. Messung der Steroidsulfatierung in gepoolten Follikel- und Corpora-lutea-Präparationen

Zur Klärung der Frage, ob Follikel- und Corpora-lutea-Gewebe die Substrate unterschiedlich stark sulfatieren, werden

unter Standardbedingungen die Cytosollösungen F_1, F_2, - aus kleinen bzw. großen Follikeln - und C_1 - aus Corpora lutea - mit Testosteron, Östron bzw. Östradiol als Substrate inkubiert.

	gebildete Steroidsulfate (pMol/g Gewebe 2h) Mittelwert ± Sp.(n= 5)		
Precursor	Cytosol F_1	Cytosol F_2	Cytosol C_1
Testosteron	380 ± 100	470 ± 300	250 ± 80
Östron	380 ± 170	210 ± 30	3760± 250
Östradiol	340 ± 80	430 ± 60	8580± 700

Tab. VIII Testosteron-, Östron- und Östradiol-17β-Sulfatierung in gepoolten Follikel- und Corpora-lutea-Präparationen unter Standardbedingungen

Aus der Tabelle VIII geht hervor, daß die Substrate Testosteron, Östron und Östradiol in den Follikelpräparationen etwa gleich sulfatiert werden. Im Corpus luteum sinkt dagegen die Testosteronsulfatierung etwas ab, während für Östron eine Steigerung der Sulfatierung ums10-fache, für Östradiol sogar um das 20-fache gefunden wurde.

4.3.3 Messung der Steroidsulfatierung in Follikeln bzw. Corpora lutea aus einzelnen Ovarien

Zur Erfassung einer individuellen Sulfatierungsrate wurden Follikel- bzw. Corpora-lutea-Präparationen aus einzelnen Ovarien untersucht. Eingesetzt wurden unter Standardbedingungen die Cytosollösungen F_3 - F_7 und C_2 - C_6, die wegen der Sammlung der einzelnen Proben etwa 3 Monate bei - 20°C eingefroren worden waren. In der Tabelle IX sind als Einzelergebnisse die Mittelwerte der in den jeweils fünf Testansätzen eines Cytosols gemessenen Steroidsulfatierung angegeben.

	gebildete Steroidsulfate (pMol/g Gewebe 2h)	
Precursor	Follikel	Corpus luteum
Testosteron	555	441
	530	504
	498	450
	709	523
	565	441
	572 ± 81 S.D.	466 ± 46 S.D.
Östron	78	336
	88	365
	81	751
	95	311
	186	212
	106 ± 47 S.D.	395 ± 207 S.D.

Tab. IX Testosteron- und Östron-Sulfatierung in Follikeln bzw. Corpora lutea aus einzelnen Ovarien, n=5

Die Sulfatierungsrate für Testosteron lag in diesen Versuchen ähnlich wie in den vorangegangenen Untersuchungen, Östron wurde dagegen sowohl in den Follikel- als auch in den Corpora-lutea-Lösungen geringer sulfatiert. Dies könnte durch einen Aktivitätsabfall der 3-Hydroxyarylsulfokinase aufgrund der langen Lagerung erklärt werden. Die Relation einer wesentlich höheren Östrogensulfatierung in Corpora-lutea-Gewebe zu derjenigen in Follikelpräparationen ist jedoch erhalten geblieben, und die Mittelwerte unterscheiden sich signifikant ($p < 0.01$).

5. DISKUSSION

Die Ergebnisse zeigen, daß in zellfreien Präparationen der Rinderovarien eine Steroidsulfatierung erfolgt, wenngleich dies nur in einem geringen Ausmaß geschieht. Dies stimmt mit Untersuchungen anderer endocriner Organe überein, in denen ebenfalls nur von einer geringen Steroidsulfatierung berichtet wird (DIXON et al. (13), MELVILLE und BRAUNSBERG (23)).
Die für die Inkubationslösungen verwandten Cytosole (105 000 x g Überstand) enthalten das gesamte sulfatierende System, sowohl die Sulfokinasen (E.C.2.8.2.4.(2.)) als auch die PAPS synthetisierenden Enzyme (NOSE und LIPMAN (27), MELVILLE und BRAUNSBERG (23)). Bei der Herstellung dieser Cytosollösungen machte jedoch die Herauslösung der Follikel aus dem umliegenden Ovargewebe Schwierigkeiten, während dies mit den Corpora lutea sehr leicht möglich war. Da aber ein Vergleich der Sulfatierungsraten im Mischovar mit denen im Follikel und Corpus luteum zeigt, daß die Sulfatierung von Testosteron, Östron und Östradiol im wesentlichen nur in den Follikeln und Corpora lutea stattfindet, und da die Follikelpräparationen aus Follikelgewebe mit sehr geringen Mengen umliegendem Stroma bestanden, kann die gemessene Sulfatierung in etwa derjenigen des reinen Follikelgewebes (Theca- und Granulosazellen) zugeordnet werden.
Ein weiteres Problem war die in höheren Konzentrationen sehr schlechte Wasserlöslichkeit der Substrate Testosteron, Östron und Östradiol, so daß nicht im Substratoptimum gearbeitet werden konnte, zumal sich durch den dann größeren Quotienten aus unmarkierten zu markierten Steroiden zu große Schwankungen im Meßsystem

ergeben hätten. Daher wurde eine Substratkonzentration von 15 nMol/ml verwandt. DAO und LIBBY (12) boten in ihrem Testsystem 50 nMol/ml Substrat an, GUGLER et al. (16) 20 nMol/ml und PAYNE und MASON (33) 55 nMol/ml. Jede Meßreihe wurde mit wenigstens drei Hauptwerten - d.h. Messung der gebildeten Steroidsulfate und freien Steroide nach zweistündiger Inkubation - und mit zwei Blindwerten - d.h. Bestimmung der jeweiligen Radioaktivität der Steroidsulfatzone auf der DC-Platte nach Aufarbeitung ohne vorherige Inkubation - durchgeführt. Dadurch wurden die in den einzelnen Untersuchungsreihen unterschiedlichen Blindwerte der Sulfatzone (110-230 dpm) berücksichtigt, die einmal in den jeweiligen DC-Platten - unterschiedliche Absorption der über die DC-Platte gewanderten freien Steroide - sowie auch in der Lipidzusammensetzung der untersuchten Gewebe - Follikel/Corpus luteum - ihre Ursache haben. Da nach zweistündiger Inkubation mit gekochter Enzymlösung wie auch nach direkter Aufarbeitung des Testansatzes ohne Inkubation gleiche Aktivitäten der Steroidsulfatzonen gemessen wurden, kann es als erwiesen gelten, daß es sich bei den hier berichteten Sulfatierungen tatsächlich um rein enzymatische Reaktionen handelt.

Die gebildeten Steroidsulfate wurden hier im allgemeinen ohne Einzelnachweis in der jeweiligen Sulfatzone erfaßt. Dies ist erlaubt, weil:

1. aus einem Steroid im wesentlichen nur das entsprechende Steroidsulfat gebildet wird (persönliche Mitteilung von MAKIOLA (22)) und das DC-Laufmittel andere Monosulfate und auf jeden Fall Disulfate abtrennt.

2. Östradiolsulfat zumindest vorwiegend als 3- und nicht als 17-Monosulfat vorliegt, wie sich in verschiedenen DC-Systemen nachweisen ließ (OERTEL et al. (30))

- das 3,17-Östradioldisulfat wird offenbar höchstens in ganz geringem Umfang gebildet (44) -.

3. eine wesentliche Metabolisierung der Steroide unwahrscheinlich ist, da nur der mikrosomenfreie 105 000 x g Oberstand als Cytosollösung verwendet wurde, in dem vermutlich die entsprechenden Enzymsysteme fehlen.

In den Vorversuchen wurden die für die Testosteronsulfatierung günstigsten Konzentrationen der Cofaktoren (ATP, SO_4^{--}, Mg^{++},APS) getestet. Da die Cofaktoren somit für dieses Enzym in ausreichenden Mengen in der Standardinkubationslösung vorhanden waren, wurden nicht alle Untersuchungen mit Östron und Östradiol als Substrate wiederholt. In Obereinstimmung mit MELVILLE und BRAUNSBERG (23), jedoch im Gegensatz zu DAO und LIBBY (12) erwies sich 1µMol/ml ATP günstiger als 5 µMol/ml.
Die Steroidsulfatierung war sowohl der Enzymkonzentration (0.1, 0.2, 0.4ml Cytosol/Inkubationsansatz) als auch der Inkubationszeit (0-120min) direkt proportional. DAO und LIBBY (12) fanden in untersuchten Mammacarcinomgeweben der Frau eine Linearität zwischen Sulfatierung und Enzymkonzentration - bis 0.3ml Tumorextrakt - bzw. der Inkubationszeit - bis 120 min -. GUGLER et al. (16) berichtet von einer linearen Zeitabhängigkeit während 180 min.
Wie aber bereits aus der Literatur (27) bekannt und sich in den folgenden Untersuchungen auch auswirkte, gibt es zwei verschiedene Sulfokinasen, eine Alkohol- und eine Phenolsulfokinase. So lag das pH-Optimum für die Sulfokinase mit Testosteron als Substrat bei pH 7.4, während die Sulfokinase mit Östron als Substrat ein breites pH-Optimum von 7.4-9.0 besaß, was möglicherweise auch durch eine bessere Löslichkeit dieser Steroide

als Phenolate im alkalischen Milieu bedingt sein kann. Dies stimmt mit Berichten von ADAMS und POULOS (6) - Rinderleber: pH-Optimum für die DHEA-Sulfatierung 7.4 -, von GUGLER et al. (16) - menschliches Lebergewebe: pH-Optimum für die DHEA-Sulfatierung 7.4 - und von DAO und LIBBY (12) - Mammacarcinomgewebe einer Frau: pH-Optimum für die DHEA - und Östradiol-Sulfatierung 7.6 - überein.

Für die Testosteron-, Östron- bzw. Östradiolsulfatierung ergaben sich unterschiedliche K_M-Werte (30, 4 bzw. 10 µMol/l), die maximalen Umsatzgeschwindigkeiten sind jedoch in etwa vergleichbar (Abb. VII). Da die Sulfokinase eine größere Affinität für die Östrogene besitzt, weist dies darauf hin, daß Östrogene gegenüber Testosteron bei gleichzeitiger und gleichgroßer Anwesenheit im ovariellen Gewebe bevorzugt sulfatiert werden. Hierbei muß jedoch berücksichtigt werden, daß im Ovargewebe Östrogene in relativ höherer Konzentration als Testosteron vorliegen (Messung RIA: Östrogen 2,5 - 5pMol/ml bzw. Testosteron 1,5-4 pMol/ml Cytosol). ADAMS und POULOS (6) geben in ihren Untersuchungen mit Rinderleber den K_M-Wert für Östradiol mit 14 µMol/l, BANERJEE und ROY (8) in ihren mit Meerschweinchenleber den K_M-Wert für DHEA mit 20 µMol/l und GUGLER et al. (16) in ihren mit menschlichen Lebergeweben den K_M-Wert für DHEA mit 6.5 µMol/l an.
Die Sulfokinasen für Testosteron, Östron bzw. Östradiol als Substrat verhielten sich in den verschiedenen Ovargeweben ganz unterschiedlich. So war die Sulfatierung von Testosteron im Mischovar und in den Präparationen aus Follikeln bzw. Corpora lutea ungefähr konstant, während die Östrogene im lutealen Gewebe weitaus stärker

sulfatiert wurden als im Mischovar und in den Follikeln. Eine ähnliche Beobachtung wurde von STURM et al. (48) in neueren Experimenten mit unreifen weiblichen Ratten gemacht. Nach Stimulation mit HCG/HMG blieb zwar die DHEA-Sulfatierung in den Ovarien gleich groß, aber die Sulfatierungsrate der Östrogene nahm zu. Zum anderen wurde in Ovarien scheinschwangerer Ratten mit überwiegend Corpora lutea eine ungefähr sechsmal größere Fähigkeit zur Östrogensulfatsynthese als in normalen Ovarien gefunden. Diese Ergebnisse lassen eine gewebsabhängige und damit zumindestens indirekt gonadotropinabhängige Arylsulfokinaseaktivität im Follikel- und Corpora-lutea-Gewebe vermuten. Auch der Bericht von GIORGI (15) unterstützt diese Ergebnisse. Danach überwiegen in der menschlichen Follikelflüssigkeit die freien Östrogene gegenüber den sulfatierten erheblich, während in der Corpus-luteum-Cysten-Flüssigkeit die freien und konjugierten Steroide in gleicher Konzentration gemessen werden. Ebenso interessant sind die aus jüngster Zeit stammenden Beobachtungen von PACKS und BROOKS (31) über eine zyklusabhängige Sulfokinaseaktivität im Schweineuterus. Neben den Sulfokinasen spielen die Steroidsulfatasen eine Rolle im Steroidstoffwechsel. So berichteten SANDBERG und JENKINS (38) 1966 von einer Sulfataseaktivität im Rinderovar, und sie nahmen an, daß Steroidsulfate aus dem peripheren Blut durch diese Enzyme als Substrate weiter verstoffwechselt werden können. STURM et al. (47) fanden entsprechende Sulfataseaktivitäten in ovariellen Tumorgeweben

des Menschen und in Ratten- und Rinderovarien. DOMINGUEZ et al. (14) berichten 1975, daß die Sulfatase, welche Pregnenolon- und DHEA-Sulfat spaltet, und für die sie eine unterschiedliche Affinität besitzt, die Konzentration der Vorstufen der Corticosteroidsynthese durch Produkthemmung zu regulieren vermag. Die Autoren nahmen weiterhin an, daß eine ACTH-Stimulation die Konzentration dieses Enzyms erhöht, so daß dadurch der gesamte Stoffwechselweg reguliert werden kann. NOTATION (28), der in seinen Untersuchungen Hodengewebe der Ratte verwandte, entwarf ein Modell, wonach Substrate, z.B. Cholesterinsulfat, an der Androgenbiosynthese im Wirkungsort der Hormone - selbst Steroide - beteiligt werden können, indem sie an der Zellmembran durch hormonell gesteuerte Sulfatasen gespalten werden.

Die Steroidsulfate übernehmen also in den endokrinen Organen ganz unterschiedliche Aufgaben, z.B. als inaktive Produkte, aber auch als Vorstufen von aktiven Hormonen und als Regulatoren der Steroidbildung (DOMINGUEZ et al. (14), NOTATION (28)).

Ober die gleichzeitige Wirkung der Sulfatasen und Sulfokinasen auf den Zellstoffwechsel in vivo kann nur schwer etwas gesagt werden, da sie in verschiedenen Zellkompartimenten - die Sulfatasen in den Membranen, die Sulfokinasen im Cytosol - lokalisiert sind. Aber gerade hierdurch vermögen sie wahrscheinlich die Konzentration der sehr unterschiedlich membrangängigen Steroide und Steroidsulfate in den einzelnen Zellkompartimenten zu beeinflussen.

Die in der vorliegenden Untersuchung gebildeten Östrogensulfate können nicht aus sulfatierten Vorstufen entstanden sein. So stammen auch die von STURM et al. (44) in Perfundaten menschlicher Ovarien nachgewiesenen Östrogensulfate wahrscheinlich nicht aus sulfatierten Metaboliten, da die Möglichkeit eines Stoffwechselweges über C-19-dienolon-3-sulfate ausschließbar erscheint. Deshalb kann eine direkte Sulfatierung der im Ovar vorhandenen freien Östrogene angenommen werden, wodurch z.B. ein Gleichgewicht zwischen freien und konjugierten Steroiden eingestellt werden kann. Auf diese Weise mag die Bildung der Östrogensulfate für die Steuerung bis jetzt noch unbekannter biologischer Schritte notwendig sein, z.B. für Steroidsynthesewege oder für die Ausprägung von LH-Receptoren im Ovar; für diese gonadotropinabhängigen Änderungen im Ovar sollen die Östrogenkonjugate gemeinsam mit Ca^{++} permissiv wirken (TRÄGER (49)). Die hier und von STURM et al. (48) gemachte Beobachtung eines stimulierenden Einflusses der Gonadotropine auf die Arylsulfokinaseaktivität unterstützt eine solche Annahme. Diese bedarf aber noch weiterer Untersuchungen und einer Klärung der Bedeutung der Steroidsulfate und damit der Sulfokinasen und Sulfatasen für solche hormonellen Regulationen auf ovarieller Ebene.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Obwohl gegenüber anderen Steroid-produzierenden Organen die Kapazität des Ovarialgewebes zur Sulfatierung von Steroiden vergleichsweise niedrig ist, kann dennoch den Steroidsulfaten auf Grund ihrer physikalischen Eigenschaften hinsichtlich der Membrangängigkeit und der Kompartimentierung im Ovar selbst eine bedeutende Funktion zukommen.
Hier wurden die Steroid-Alkohol- bzw. -Phenol-Sulfokinasen im Rinderovar untersucht. Zunächst wurde ein Verfahren für diese im 105 000 x g Oberstand befindlichen Enzyme (E.C.2.8.4.(2)) aufgebaut und dabei unter verschiedenen Inkubationsbedingungen die Inkorporation der Radioaktivität aus ^{14}C-markierten Androgenen und Östrogenen in die dünnschicht-chromatographisch isolierten Steroidsulfate gemessen.

Die Abhängigkeiten der Enzymaktivitäten vom pH, sowie der Coenzym- und Kationenkonzentration wurde geprüft und ein Test angegeben, bei dem die Sulfatierung der Enzymmenge und der Inkubationszeit direkt proportional ist. Die Bildung des Testosteronsulfates weist ein ausgeprägtes Optimum bei pH 7.4 auf, während diejenige der Östrogensulfate zwischen pH 7.4 und 9.0 ein breites Maximum besitzt, was auf das Vorliegen zweier unterschiedlicher und auch aus der Literatur bekannter Enzymsysteme hindeutet. Die K_M-Werte für Testosteron, Östradiol und Östron wurde graphisch nach LINEWEAVER und BURK zu 30, 10 und 4 µMol/l ermittelt.
Unter den gewählten Bedingungen sulfatierte Corpora-lutea-Gewebe gegenüber Follikeln des Rinderovars Östrogene bis zu zwanzigmal stärker;

beide Gewebe wiesen jedoch etwa gleiche Sulfatierungsraten für Testosteron auf. Aus dieser nur bei den Östrogenen beobachteten Abhängigkeit der Sulfatierung von der Zyklusphase kann so zumindestens auf eine indirekte Gonadotropinabhängigkeit der Östrogensulfokinase geschlossen werden, was z.B. für die Kontrolle der Steroidogenese im Ovar von Bedeutung sein könnte.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aakvaag, A., and Fylling, P. (1968)
A methode for the simultaneus determination of progesterone, androstenedione, testosterone and dehydroepiandrosterone in biological fluids.
Acta Endocr. 57, 447

2. Adams, J.B. (1963)
Formation of steroid sulfates by extracts of human adrenals.
Biochim. Biophys. Acta 71, 243

3. Adams, J.B. (1964)
Enzymic synthesis of steroid sulfates. I. Sulfation of steroids by human adrenal extracts.
Biochim. Biophys. Acta 82, 572

4. Adams, J.B., and Poulos, A. (1967)
Enzymic synthesis of steroid sulfates. III. Isolation and properities of estrogene sulfotransferase of bovine adrenal glands.
Biochim. Biophys. Acta 146, 493

5. Adams, J.B., and Chulavatnatol, M. (1967)
Enzymic synthesis of steroid sulfates. IV. The nature of the two forms of estrogene sulfotransferase of bovine adrenals.
Biochim. Biophys. Acta 146, 509

6. Adams, J.B. (1967)
Enzymic synthesis of steroid sulfates. V. On the binding of estrogenes to estrogene sulfotransferase.
Biochim. Biophys. Acta 146, 522

7. Banerjee, R.K., and Roy, A.B. (1966)
The sulfotransferases of guinea pig liver.
Mol. Pharmacol. 2, 56

8. Banerjee, R.K., and Roy, A.B. (1967)
The formation of cholesteryl sulfate by androstenolone sulfotransferase.
Biochim. Biophys. Acta 137, 211

9. Baulieu, E.E. (1962)
Conjugated 17-ketosteroids in a case of adrenal tumor.
J. clin. Endocr. Metabol. 22, 501

10. Boström, H., and Wengle, B. (1964)
Ester sulfates. XIX. Sulfate conjugation in adult human liver extracts.
Acta Soz. Med. Upsalien 69, 41

11. Cohn, G.L., Mulrow, P.J., and Dunn, V.C. (1963)
In vitro synthesis of dehydroepiandrosterone sulfate by adrenal adenoma.
J. clin. Endocr. Metabol. 23. 671

12. Dao, T.L., and Libby, P.R. (1968)
Conjugation of steroid hormones by normal and neoplastic tissues.
J. clin. Endocr. 28, 1431

13. Dixon, R., Vincent, V., and Kase, N. (1965)
Biosynthesis of steroid sulfates by normal human testis.
Steroids 6, 757

14. Dominguez, O.V., Valencia, S.A., and Loza, A.C. (1975)
On the role of steroid sulfates in hormone biosynthesis.
J. Steroid Biochem. 6, 301

15. Giorgi, E.P. (1967)
Determination of free and conjugated oestrogens in fluid from human

ovaries.
J. Endocr. 37, 211

16. Gugler, R., Rao, G.S., und Breuer, H. (1970)
Reinigung und Charakterisierung einer 3'-Phosphoadenylsulfat: Steroid-Sulfotransferase aus der Leber des Menschen.
Biochim. Biophys. Acta 220, 69

17. Hawkins, R.A., and Oakey, R.E. (1974)
Estimation of oestrone sulphate, oestradiol-17β and oestrone in peripheral plasma, concentrations during the menstrual cycle and in men.
J. Endocr. 60, 3

18. Holcenberg, J.S., and Rosen, S.W. (1965)
Enzymatic sulfation of steroids by bovine tissues.
Arch. Biochem. 110, 551

19. Kalliala, K., Laatikainen, T., Luukkainen, T., and Vihko, R., (1970)
Neutral steroid sulfates in human ovarian vein blood.
J. clin. Endocr. Metabol. 30, 533

20. Laatikainen, T., Laitinen, E.A., and Vihko, R., (1971)
Secretion of free and sulfate conjugated neutral steroids by the human testis. Effect of administration of HCG.
J. clin. Endodr. Metabol. 32, 59

21. Laatikainen, T., and Vihko, R. (1971)
Plasma neutral steroid sulfates and the menstrual cycle.
J. of Steroid Biochem. 2, 173

22. Makiola, K. (1978) In vitro Studien zur Steroidsulfatierung im Rinderovar
Dissertation
eingereicht im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

23. Melville, E., and Braunsberg, H. (1973)
Steroid sulphation by human female reproductive tissues in vitro.
Biochem. Soc. Transactions 1, 757

24. Moser, H.W., Moser, A.B., and Orr, J.C. (1966)
Preliminary observations on the occurrence of cholesterol sulfate in man.
Biochim. Biophys. Acta 116, 146

25. Munson, P.L., Gallagher, T.F., and Koch, F.C. (1942)
The 17-ketosteroid-complex in normal men's urine
Endocrinology 30, 1036

26. Munson, P.L., Gallagher, T.F., and Koch, F.C. (1944)
Isolation of dehydroepiandrosterone sulfate from normal male urine.
J. biol. Chem. 152, 67

27. Nose, Y., and Lipman, F. (1958)
Seperation of steroid sulfokinases.
J. biol. Chem. 233, 1348

28. Notation, A.D. (1975)
Regulatory interactions for the control of steroid sulfate metabolism.
J. Steroid Biochem. 6, 311

29. Nunez, M., Aedo, A.R., Landgren, B.-M., Cekan, S.Z., and Diczfaluzy, E. (1977)
Studies on the pattern of circulating steroids in the normal menstrual cycle.
Acta endocr. 86, 621

30. Oertel, G.W., Treiber, C., Wenzel, D., Knapstein, P., Wendberger, F., and Menzel, P. (1968)
In vivo perfusion of the human ovary

with 4-^{14}C-dehydroepiandrosterone and 7a-^{3}H-dehydroepiandrosterone-^{35}S-sulfate.
Experientia 24, 607

31. Pack, B.A., and Brooks S.C. (1974)
Cyclic activity of oestrogen sulfotransferase in the gilt uterus.
Endocrinology 95, 1680

32. Payne, A.H., and Mason, M. (1963)
The enzymic synthesis of the sulfate esters of 17-ß-estradiol and diethylstilbestrol.
Biochim. Biophys. Acta 71, 719

33. Payne, A.H., and Mason, M. (1965)
Sulfurylation of oestradiol-17ß by extracts of ovary, corpus luteum, testis and adrenal cortex.
Steroids 5, 21

34. Robbins, P.W., and Lipmann, F. (1958)
Separation of two enzymatic phases in active sulfate synthesis.
J. biol. Chem. 233, 681

35. Robbins, P.W., and Lipmann, F. (1958)
Enzymatic synthesis of adenosin-5'-phosphosulfate.
J. biol. Chem. 233, 686

36. Roy, A.B. (1960)
The synthesis and hydrolysis of sulfate esters.
Advanc. Enzymolog. 22, 205

37. Ruder, H.J., Loriaux, L., and Lippstett, M.B. (1972)
Estrone sulfate: production rate and metabolism in man.
J. clin. Endocr. Metabol. 34, 113

38. Sandberg, E.C., and Jenkins, R.C. (1966)
Aryl and steroid sulfatase in human ovary.
Biochim. Biophys. Acta 113, 190

39. Schachter, B., and Marrian, G.F. (1936)
Observation on conjugated estrogens in urine of pregnant mares.
Proc. Soc. Exptl. Biol. 35, 222

40. Schachter, B., and Marrian, G.F. (1938)
The isolation of estrone sulfate from the urine of pregnant mares.
J. biol. Chem. 126, 663

41. Stähler E., und Huch, A. (1971)
Untersuchungen am isoliert perfundierten Ovar des Rindes.
Arch. Gynäk. 211, 527

42. Sturm, G., und Stähler, E. (1972)
Untersuchungen zur Steroidbiosynthese an in vitro perfundierten Rinderovarien verschiedener Funktionszuständen.
Arch. Gynäk. 211, 545

43. Sturm, G., and Stähler, E. (1973)
The influence of gonadotrophins on steroid metabolism in human ovary perfused in vitro.
Acta endocr. 177, 340

44. Sturm, G., Stähler, E., and Grosch, B. (1974)
Steroid metabolisation and conjugation in the human ovary perfused in vitro.
J. Steroid Biochem. 5, 313

45. Sturm, G., Stähler, E., and Daume, E. (1975)
Steroid sulfatation in human ovaries with Graafian follicles during in vitro perfusion.
Acta endocr. 193, 104

46. Sturm, G., and Stähler, E. (1976)
Use of GC-MS and massfragmentography for detection, identification and quantitation of secreted steroids by the human ovary perfused in vitro.
Z. Anal. Chem. 279, 164

47. Sturm, G., Daume, E., Hannappel, E., Motzny, S., and Jurascheck, E. (1977)
Studies on steroid sulfate formation in the ovary.
Acta endocr., 212, 70

48. Sturm, G., and Hannappel, E. (1978)
Intra-ovarian formation of steroid sulfates: measurement and influence of gonadotrophins.
eingereicht zur Publication im J. Endocr.

49. Träger, L. (1977)
Steroid-Hormone
Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York; Seite 82

50. Venning, E.H., Hoffmann, M.M., and Browne, J.S.L. (1942)
Isolation of androsterone sulfate.
J. biol. Chem. 146, 369

51. Wallace, E., and Lieberman, S. (1963)
Biosynthesis of dehydroepiandrosterone sulfate by human adrenocortical tissue.
J. clin. endocr. metabol. 23, 90

52. Wallace, E., and Silberman, N. (1964)
Biosynthesis of steroid sulfates by human ovarian tissue.
J. biol. Chem. 239, 2809

53. Wieland, R.G., Levy, R.P., Katz, D., and Hirschmann, H. (1963)
Evidence for secretion of 3ß-hydoxy-androst-5-en -17-one sulfate by

meesurement in normal human adrenal venous blood.
Biochim. Biophys. Acta 78, 566

54. Wilson, L.G., and Bandurski, R.S. (1958)
Enzymatic reactions involving sulfate, sulfite, selenate and molybdate.
J. biol. Chem. 233, 975

55. Wotiz, H.H., Ziskind, B.S., Lemon, H.H., and Gut, M. (1956)
Steroid metabolism. IV.Evidence for the formation of a watersoluble conjugate during in vitro incubations of human tissue with testosterone.
Biochim. Biophys. Acta 22, 266

Lebenslauf

Am 1.11.1952 wurde ich in Hadamar geboren als fünftes Kind des Studiendirektors Walter Hannappel und seiner Ehefrau Elisabeth, geborener Niemann.

Von Ostern 1959 bis Ostern 1963 besuchte ich die Volksschule II in Hadamar und wechselte dann auf das altsprachliche Fürst-Johann-Ludwig Gymnasium in Hadamar. Dort machte ich am 15. Juni 1971 das Abitur.

Zum Wintersemester 1971/72 immatrikulierte ich mich an der Medizinischen Fakultät der Philipps-Universität Marburg und bestand dort nach dem Sommersemester 1972 die naturwissenschaftliche und nach dem Wintersemester 1973/74 die ärztliche Vorprüfung. Daraufhin studierte ich nach der Approbationsordnung für Ärzte vom 28.10.1970 weiter und legte den ersten Abschnitt des Staatsexamens nach dem Sommersemester 1975 und den zweiten nach dem Wintersemester 1976/77 in Marburg ab. Mein praktisches Jahr machte ich vom April 1977 bis zum März 1978 an den Universitätskliniken Marburg. Im April 1978 bestand ich sowohl den mündlichen als auch den schriftlichen Teil des dritten Abschnitts des Staatsexamens.

Seit dem 1. September 1978 arbeite ich als Assistent im Anatomischen Institut der Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren in Marburg
die Frauen und Herren Professoren und Dozenten:

Ammon, Aziz, Baltzer, Bode, Börngen, Braasch,
Buchholz, Castenholz, Daume, Dauner, Dennhardt,
Dieterich, Dittrich, Dimroth, Dombrowski, Drews,
Egbrink, Eißner, Eschenbach, Exner, Friederich,
Fruhstorfer, Ganz, Gerdes, Goebel, Golenhofen,
Graul, Grundner, Haberich, Habermehl, Hamelmann,
Hardewig, Havemann, Heene, Hensel, Hess, Hilde-
brandt, Hilgermann, Hort, Huch, Ihm, Joseph,
Kalbfleisch, Kaffarnik, Karlson, Kessler, Klaus,
Kleine, Kleinsasser, Knauff, Koecke, Koransky,
v.Kraft, Kuni, Lange, Latta, Lauer, Lennartz,
Lehmann, Lorenz, Ludwig, Lütcke, Mannheim,
Maroske, Martini, Massarat, Neurath, Nier,
Oepen, Perst, Petry, Pohlen, Popp, Portig,
Pots, Priebe, Richter, Riecken, Rodeck, Rohde,
Rohen, Rupec, Schachtschabel, Schaumlöffel,
Schiff, Schmid, Schmitz-Moormann, Schneider,
Seifart, Sekeris, Siegert, Slenczka, Sodomann,
Solcher, Straub, Sturm, Stutte, Spalke, Thoenes,
Troidl, Uhlarik, Welge-Lüssen, Wendt, Wesemann,
Wiegandt, Willenbockel.